

明細書

多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法
および当該調整方法により得られたナノ粒子

5

技術分野

本発明は、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法、特に多価金属無機塩として、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムの皮膜を被覆したレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法、および当該調整方法により得られたナノ粒子に関する。

10

背景技術

近年、脂溶性ビタミンA酸であるレチノイン酸のES細胞 (embryo stem cell : 胚幹細胞)を含む種々の未分化細胞における分化誘導作用が注目されてきており、また、レチノイン酸の急性前骨髄性白血病に対する治療薬としての臨床的利用がなされている。

15

しかしながら、レチノイン酸は分子内にカルボキシル基を有する化合物であることから刺激性があり、皮下投与した場合には炎症もしくは注射部位の腫瘍化が認められ、また、脂溶性のために注射剤としての製剤化は困難なものである。したがってレチノイン酸については、種々の徐放化製剤、あるいはターゲット療法としてのドラッグデリバリー・システム (DDS) を応用した製剤化が検討されている [例えば、C. S. Cho, K. Y. Cho, I. K. Park, S. H. Kim, T. Sugawara, M. Uchiyama & T. Araiike: "Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly (L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene", J. Control Release, 2001 Nov. 9:77(1-2), 7-15]。

20

また、生分解性ポリマーを使用した注射製剤も提案されている [例えば、G. G. Giordano, M. FD. Refojo & M. H. Arroyo: "Sustained delivery of retinoic acid from microspheres of biodegradable polymer in PVR", Invest. Ophthalmol. Vis., 1993 Aug. 34(9): 274-2745]。

25

さらにレチノイン酸は、上皮細胞増殖作用のため、皮膚のシワとり、皮膚の活性化・老化防止剤等として化粧品への応用が提案されている（Japanese Patent Laid-open Publication No. Hei 09-503499）が、カルボン酸としての性質のため、刺激性が強く、炎症を起す等の問題点があり、現実の化粧品への使用は不可能である。

かかる現状を鑑み、本発明者等は先に、皮下および静脈内注射が可能であり、徐放性製剤として使用することができるとともに、また皮膚に塗布した場合にはレチノイン酸の有する効果を有効に発揮し得る、レチノイン酸含有のナノ粒子を提供している [例えば、特願 2003-172493；薬剤学, Vol. 62 Mar. 2002, Supplement, 日本薬剤学会第 17 年会講演要旨集；Drug Delivery System (DDS), Vol. 18, No. 3 May.:221 (2003)；29th Annual Meeting of the Controlled Release Society in Collaboration with the Korean Society for Biomaterials；Final Program July 20-25 (2002)]。

先に提案しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸を少量の極性溶媒に溶解して、アルカリを含む水で分散させ、次に非イオン性界面活性剤を添加することより得られた混合ミセルに、2 価の金属塩を添加し、さらに 2 価の陰イオンをもつ塩を添加することにより調製されたものである。

かかるレチノイン酸含有のナノ粒子は、粒子表面に金属化合物の皮膜を形成してなるものであり、例えば 2 価の金属塩として塩化カルシウムを使用し、2 価の陰イオンをもつ塩として炭酸ナトリウムを使用した場合には、ナノ粒子表面に炭酸カルシウムの皮膜が形成されることとなる。

この本発明者等が先に提供しているレチノイン酸含有のナノ粒子は、レチノイン酸の両親媒性を利用して調製したものである。すなわち、レチノイン酸を水溶液中に分散させることにより、一旦球状ミセルに形成させ、ミセル表面をマイナス荷電に覆われた状態とする。次いで、非イオン性界面活性剤を添加し、さらに塩化カルシウムを添加することにより、ミセル表面のマイナス荷電にカルシウムイオン (Ca^{2+}) を吸着させ、レチノイン酸のミセル同士の凝集・沈澱を防ぐことによりミセル表面がカルシウムイオンで覆われた球状、もしくは卵形等を有するミセルとする。さらに炭酸ナトリウムを添加して、炭酸イオン (CO_3^{2-}) を

ミセル表面のカルシウムイオンに吸着（結合）させて、ミセル表面荷電を完全に中和させる。その結果、レチノイン酸のミセル表面に炭酸カルシウム皮膜が形成され、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子が調製される。

ところで一般に、沈澱法もしくは均一沈澱法で形成される炭酸カルシウム結晶は、通常カルサイトと呼ばれる水に対しての溶解性が殆どない結晶である。しかしながら、上記の方法でミセル表面に形成される炭酸カルシウムは、球状、もしくは卵形等を有する曲率をもつミセル表面に形成されていることより、硬い結晶構造をとりにくい。したがって、形成された炭酸カルシウム層は、いわゆるガラス構造を有するアモルファスもしくは準安定相であるバテライト構造を有している。炭酸カルシウム皮膜がアモルファスである場合は、硬い結晶構造でないことから、水への溶解性が高く、生分解性が向上し、容易に分解される。またバテライトを形成した場合は、一般に、炭酸カルシウムの他の結晶構造であるカルサイトあるいはアラゴナイトに比較して水への溶解度が高いため、容易に生分解される。

その結果、上記で得られた炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を生体内に投与等した場合には、ミセル表面の炭酸カルシウム皮膜層が容易に分解し、含有されているレチノイン酸が放出され、その結果、薬効を徐放的に発揮するものである。

レチノイン酸のミセル表面を金属化合物で被覆する場合には、上記した炭酸カルシウムのみならず、生体適合性を有する、例えば炭酸亜鉛、リン酸カルシウム等の多価金属無機塩であっても、同様の効果を発揮するものである。

しかしながら、上記のようにして形成された炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、5～1000nm程度の粒子径（直径）を有するものであって、所望の粒子径を有するナノ粒子を効率よく調製することができていない。特に、レチノイン酸を皮下あるいは静脈内投与する場合、または皮膚投与（塗布投与等）し、経皮吸収させる場合にはその粒子径は5～300nm程度の極めて微細なナノ粒子であることが好ましい。

したがって本発明は、炭酸カルシウムをはじめとする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子について、その粒径を5～300nm程度の極めて微細なナノ

粒子とする、粒径の調整方法を提供することを課題とする。

かかる課題を解決するために、本発明者等は鋭意検討した結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成させる段階で、当該ミセルに添加させる金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物とのモル比を適宜調整することにより、平均粒子径が5～300nm程度の粒径を有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を調製し得ることを新規に見出し、本発明を完成させるに至った。

発明の開示

したがって本発明は、基本的態様として、

(1) レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、およびアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1:0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることを特徴とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(2) ミセル表面に被覆される多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(3) 2価金属ハロゲン化物または酢酸化物が、カルシウムハロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛である上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(4) カルシウムハロゲン化物または亜鉛ハロゲン化物が、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛からなる群から選択されるものである上記(3)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(5) アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物が、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムからなる群から選択されるものである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

5 (6) 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(7) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン(8)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン(20)コレステロールエステル、ポリオキシエチレン(30)コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である上記(1)に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

15 である。

本発明は、さらに具体的な態様として、

(8) レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

20 レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムを、モル比で1:0~1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に炭酸カルシウムの皮膜を形成し、その平均粒子径を5~300nmの範囲内とすることを特徴とする請求の範囲第1項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

25 (9) 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである上記(8)に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

(10) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)

ソルピタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルピタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である上記（8）に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法；

である。

また本発明は、別の態様として、

（11）上記（1）ないし（7）のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子；

（12）上記（8）ないし（10）のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子；

（13）レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する炭酸カルシウム被覆ナノ粒子；

（14）レチノイン酸のミセル表面を炭酸亜鉛の皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子；

（15）レチノイン酸のミセル表面をリン酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子；

である。

本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、その平均粒子径が5～300nmの範囲内と、所望する極めて微細なものに調整されたものである。

レチノイン酸が皮下投与された場合には、その高い刺激性と脂溶性のため、投与部位に炎症もしくは腫瘍化が認められる。また水に不溶であることから、注射剤としては不向きであった。本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下およ

び静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、生体適合性の多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を有する。

さらに、本発明のナノ粒子を外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮でき、外用剤あるいは化粧品に用いることもできる。

特にレチノイン酸を皮膚に塗布した場合には、上皮細胞の増殖をもたらし、新たな皮膚再生に極めて効果的なものであり、美白、シワとりに効果的な化合物であるが、これまで皮膚刺激性のため使用されていなかった。しかしながら、多価金属無機塩を被覆したナノ粒子としたことにより、刺激性を低減し、また平均粒子径が5～300nmと微細なものであることから、皮膚浸透性が向上し、レチノイン酸の血中動態が上昇し、短時間のうちにレチノイン酸が血中に存在し、また徐放的に長時間に亘って、血中濃度を維持し得る利点を有している。

その結果、上皮細胞の増殖因子であるHB-EGF (HB-Epidermal Growth Factor) の産生量が上昇し、また、表皮内では通常短時間で産生されないヒアルロン酸の産生が誘導されることから、皮膚再生が早まることとなり、表皮の肥厚が顕著に認められる特性を有している。したがって、再生医療への応用として、極めて有用なものである。

20

図面の簡単な説明

第1図は、試験例1の(1)における、炭酸ナトリウムを添加した際の溶液の透過度変化を示した図である。

第2図は、試験例1の(2)における、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させ、レチノイン酸ミセルと混合してレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を調製する場合のゼータ電位の変化を示した図である。

第3図は、試験例5における、メラノーマ細胞のレチノイン酸刺激による³H-チミジン取り込み量を示す図である。

第4図は、試験例6の(1)における、レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子および

レチノイン酸ミセルをラットに皮下投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

第5図は、比較例6の(1)における、比較例であるナノ粒子化していないレチノイン酸ミセルをラットに皮下投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の
5 写真である。

第6図は、試験例6の(1)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子をラットに皮下投与し、その投与後10日後の皮下投与部位の写真である。

第7図は、試験例6の(2)における、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子、レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸をワセリン基剤に混合しマウスの
10 皮膚に塗布投与した場合の血中放出レチノイン酸濃度の推移を示した図である。

第8図は、試験例7における、各製剤を投与した時の表皮の厚さの結果を示した図である。

第9図は、試験例8における、HB-EGF mRNA産生量の比較を示した図である。

15 なお、図中において、RAはレチノイン酸を、RA- CaCO_3 はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を、RA- ZnCO_3 はレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、RA-Caはレチノイン酸-Caナノ粒子を、RA-Znはレチノイン酸-Znナノ粒子を意味する。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するレチノイン酸は、生理学的には、視覚、聴覚、生殖などの機能保持、成長促進、皮膚や粘膜などの正常保持、制ガン作用等を有し、急性前骨髄球性白血病 (APL: acute promyelocytic leukemia) の治療薬として臨床的に使用されている全トランス体レチノイン酸 (*all-trans* retinoic acid) である。

25 この多価金属無機塩を被覆したレチノイン酸のナノ粒子の調製は、詳細には以下のようにして行われる。

レチノイン酸は、脂溶性化合物であり、また分子内にカルボン酸を有していることから、アルカリ水溶液、例えば水酸化ナトリウム水溶液および少量の低級アルコールを添加することにより、水溶液中で球状のミセルが形成される。このミ

セルの表面は、マイナス荷電で覆われた状態となっているため、容易に2価金属イオン、たとえばカルシウムイオン (Ca^{2+}) が吸着 (結合) し、ナトリウムイオンとの交換反応が生じる。この場合、2価金属イオンはナトリウムイオンに比較して吸着力 (結合力) が高いことから、2価金属イオンを吸着したミセルは、
5 その表面の荷電は解離しにくくなり、水に不溶化して、ミセルは沈殿する。沈殿を生じると、粒子同士の凝集が生じ、非常に大きな粒子を形成することとなる。

したがって、この段階での粒子同士の凝集を防ぐために、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレン (20) ソルピタンモノオレート (Tween 80) をレチノイン酸と共に添加する。すなわち、Tween 80 は、レチノイン酸と共に混
10 合ミセルを形成し、ミセル表面上にポリオキシエチレン鎖を突出させているため、多価金属イオンがミセル表面に吸着 (結合) しても、ミセル表面に突出した親水基としてのポリオキシエチレン鎖の存在により、ミセルの沈殿が生じないこととなる。

次いで、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、例えば塩化カルシウムを添加
15 する。この場合の2価金属ハロゲン化物または酢酸化物の添加量は、レチノイン酸のミセル表面に2価金属イオンを吸着させるに十分な量であればよい。2価の金属イオンはナトリウムイオンより吸着力 (結合力) が強く、ナトリウムイオンとの交換が生じる。その結果、2価金属イオンが優先的に吸着 (結合) することとなり、ミセル表面が2価金属イオンで覆われた球状もしくは卵形等のミセルが
20 形成される。そこに、さらにアルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物を添加すると、ミセル表面電荷は完全に中和されていないために、さらに炭酸イオン (CO_3^{2-}) あるいはリン酸イオン (PO_4^{2-}) が表面にある2価金属イオンに吸着 (結合) する。この結果、レチノイン酸のミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成されることとなり、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が
25 調製される。

かかる多価金属無機塩被覆ナノ粒子における多価金属無機塩としては、生体適合性を有する炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムをあげることができる。

したがって、2価の金属ハロゲン化物または酢酸化物としては、カルシウムハ

ロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛であり、カルシウムハロゲン化物および亜鉛ハロゲン化物としては、具体的には、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛をあげることができる。

- 5 また、アルカリ金属炭酸化物またはアルカリ金属リン酸化物としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムをあげることができる。

一方、ナノ粒子の調製に使用する低級アルコールとしては、メタノールあるいはエタノールをあげることができる。

- 10 また、非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート（Tween 80）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（Tween 20）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート（Tween 60）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート（Tween 40）、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート（Tween 85）、ポリオ
15 キシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステルおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油をあげることができる。

- 20 以上の方法により調製された多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、微細なナノ粒子ではあるが、その粒度分布は幅広く、10～3000 nm程度の粒子径（直径）を有するものであった。

- ところで、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子を皮下投与あるいは静脈内投与する場合、またさらに皮膚投与してレチノイン酸を経皮吸収させる場合には、その粒径は5～300 nm程度の極めて微細なナノ粒子であることが好ましい。
25 したがって目的とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子について、その粒径が5～300 nm程度の極めて微細なナノ粒子に調整する必要がある。

かかる粒子径の調整は、レチノイン酸のミセルの表面に形成させるために添加する、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物とのモル比を変化させることにより行い得ることが判明した。

すなわち、レチノイン酸のミセル表面への多価金属無機塩の皮膜の形成は、アルカリ（具体的にはナトリウム）水溶液中で形成されたミセルの表面のマイナス荷電を、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物による2価金属イオン、例えばカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）との交換反応、およびアルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物による炭酸イオン（ CO_3^{2-} ）またはリン酸イオン（ PO_4^{2-} ）とによる中和で行われる。

具体的には、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物の両者の比率を、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することにより、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、所望により超音波処理等の機械的振動を加え、その平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることが可能となった。

アルカリ金属炭酸化物あるいはリン酸化物を、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物1モルに対し1.0モルを超えて添加した場合には、ミセル表面上に多価金属無機塩の皮膜の形成は生じるものの、粒径が大きなものとなり、粒子同士の凝集が生じてしまい、超音波処理等の機械的振動を加えても所望の平均粒子径を有するナノ粒子を得ることができず、好ましいものではない。

しかしながら、添加する2価金属ハロゲン化物または酢酸化物と、アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物との両者の比率を、モル比を1：0～1.0の範囲内で添加した場合には、ミセル表面に多価金属無機塩の皮膜が形成され、そのうえで平均粒子径を5～300nmの範囲内とすることが可能となったのである。

なお、得られたナノ粒子は凝集体として存在している場合もあり、この場合にはかかる凝集体を超音波処理等の機械的振動を与えることにより、極めて均一な平均粒子径を有するナノ粒子に調製し得ることが判明した。したがって、本発明のナノ粒子にはそのような凝集体をも包含し、かつ上記の方法によるナノ粒子の調製を行った後、さらに超音波処理等の機械的振動を加える平均粒子径の調整を行う方法でもある。

以上のようにして調製された本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、水に溶解した場合に透明溶液の形態を保つものであり、多価金属

無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない。

- 5 さらに、外用剤として皮膚に塗布投与した場合には、良好に経皮吸収され、刺激性がないことから炎症を惹起せず、ナノ粒子から徐放的にレチノイン酸が放出され、皮膚のシワとり、活性化等の効果を発揮できるのである。

それらの点を含め、以下の試験例により、本発明を詳細に説明する。

- 10 なお、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子において、炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子」と、炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-ZnCO₃ナノ粒子」と、またリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を「レチノイン酸-CaPO₄ナノ粒子」と記載する場合もある。

試験例 1：レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の作製

- 15 レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノール（またはメタノール）に溶解し、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7 ~ 7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

- 20 約 30 分後に、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子を作製した。

なお、試験に使用したレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

- 25 (1) 炭酸ナトリウムを添加した際における溶液の透過度の変化

上記の 5 M-塩化カルシウム含有水溶液および 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液の添加に際し、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を 15 μ L 添加し、それに対応して 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液の添加量を変化させることにより、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比を変化させ、溶液の透過度変化を観

察した。

透過度は、280 nmにおける透過性（数値が大きいほど透明性が高い）で評価し、その結果を第1図に示した。

5 図中に示した結果からも判明するように、炭酸ナトリウムを添加するにしたがって、溶液は徐々に濁り始め、最終的には沈澱が観察された。沈澱が観察される領域では、溶液は、炭酸ナトリウムの添加直後から30分までは透明もしくはやや白濁状態であるが、それ以上の攪拌では沈澱が生じ始め、そのため上清液の濁度が上昇した。

10 以上の事実から、レチノイン酸ミセルに対する塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させることにより、得られるナノ粒子の粒径の調整が行い得ることが示唆された。

(2) 塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比の変化によるゼータ電位変化の測定

15 塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率を変化させ、レチノイン酸ミセルと混合してレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を調製する場合のゼータ電位の変化を測定した。

その結果を第2図に示した。

20 なお、レチノイン酸ミセルに対する塩化カルシウムのみを添加した場合のゼータ電位は+1.66 mVであり、レチノイン酸ミセルとしてのゼータ電位は-68.5 mVであった。したがって、カルシウムイオンがミセル表面に吸着していることは明らかである。

第2図の結果からも判明するように、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムのモル比を変化させることにより、ゼータ電位が変化している。炭酸ナトリウムの添加モル比が塩化カルシウム1モルに対し0.2モルまでの場合には、なだらかなゼータ電位の減少を示しているが、0.2モルを超えると急激に低下していることから、炭酸イオンの吸着が飽和に達しているか、もしくは粒子同士の凝集がはじまっていることを示唆している。

試験例 2 : レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒子径の調整に及ぼす、塩化カルシウムに対する炭酸ナトリウムの添加モル比率等の検討

(1) 添加モル比の検討

上記した試験例 1 の結果から、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を
5 変化させたレチノイン酸のミセルに添加することにより、レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒子径が調整され得ることが判明した。

したがって次に、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムのモル比を変化させて
レチノイン酸のミセルに添加させることにより得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒子径の変化について検討した。

10 その結果、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 0. 2 モルまでの範囲内で添加した場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒径は 10 ~ 50 nm の値を有するものであった。

また、塩化カルシウム 1 モルに対して、炭酸ナトリウムの添加量を 0. 2 モルを超える範囲とした場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の粒径は、
15 350 nm 以上を有するものであり、これは微細なナノ粒子が凝集して、凝集塊として大きな平均粒子径を有する値を示しているものであった。

これらの事実は、上記試験例 1 の (2) のゼータ電位の変化と一致するものであった。

したがって、この凝集塊が超音波処理により微細なナノ粒子に分散しうるものであるかを以下に検討した。
20

(2) 超音波処理を行ったレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の流体力学的直径の測定

上記で得られたレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子について、調製後 5 分間超音波処理を施した後の粒子径を測定した。

25 その結果、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 1. 0 モルまでの範囲内で添加した場合には、得られるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の凝集塊は、超音波処理により分散し、それぞれ粒径が 300 nm のまでのナノ粒子に分散した。しかしながら、塩化カルシウム 1 モルに対して炭酸ナトリウムを 2. 0 モルおよび 3. 0 モル添加させて得たレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子の凝集塊 (平均粒

子径：約2700nmおよび2200nm）は、超音波処理しても、その凝集塊を分散させることができなかった。

これらの結果をまとめて表1に示した。

5 第1表：ナノ粒子の粒径に及ぼす塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムの比率

	レチノイン酸-CaCO ₃ ナノ粒子の平均 粒子径(直径：nm)				
CaCl ₂ /NaCO ₃ のモル比	1/0	1/0.01	1/0.1	1/0.2	1/0.3
調製直後の平均粒子径 (nm)	20.2	23	17.3	30.3	356.3
超音波処理後の平均粒子径(nm)	—	—	—	22.4	33.3
CaCl ₂ /NaCO ₃ のモル比	1/0.5	1/1.0	1/2.0	1/3.0	
調製直後の平均粒子径 (nm)	1316.2	1450	2687.3	2240.5	
超音波処理後の平均粒子径(nm)	41.1	106.4	2197.3	1349.4	

10 以上の事実からみれば、本発明においては、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0～1.0の範囲内で添加させてレチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成させ、さらに超音波処理を施すことにより、レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の平均粒子径の調整が極めて効果的であることが理解される。

15 なお、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1：0.2で添加することによりレチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成させ、その粒径を調整して得たレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の凍結割断透過型電子顕微鏡写真(freeze-fracture Transmittance Electron Microscopy: ff-TEM)を観察した結果、真横に割段されたレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、いわゆるコア-シェル(core-shell)構造を有していることが観察された。

したがって、レチノイン酸をコアにして、炭酸カルシウム膜をシェルとした構造が形成されているものと思われる。

試験例 3：レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノールに溶解して、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7~7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

約 30 分後に、5 M-酢酸亜鉛含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-炭酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とする炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子（レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子）を作製した。

- 10 作製されたレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子の粒子径は、上記の試験例 1 および 2 と同様の挙動を示すものであった。

なお、試験に使用したレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子は、凍結乾燥後のナノ粒子を注射用蒸留水で所定の濃度に再分散させ、使用した。

15 試験例 4：レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の作製

レチノイン酸 13.6 mg を 900 μ L のエタノールに溶解して、この溶液に 0.5 N-NaOH 水溶液の 100 μ L を加えた。このときの pH は、7~7.5 であった。この溶液を母液として 100 μ L 採取し、これを Tween 80 を含む蒸留水 100 μ L に加え、よく攪拌した。

- 20 約 30 分後に、5 M-塩化カルシウム含有水溶液を加え攪拌し、さらに 30 分後に 1 M-リン酸ナトリウム含有水溶液を加え、さらに攪拌した。一昼夜攪拌を継続した後、得られた溶液を一夜凍結乾燥し、目的とするリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子（レチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子）を作製した。

- 25 作製されたレチノイン酸-CaPO₄ ナノ粒子の粒子径も、上記の試験例 1 および 2 と同様の挙動を示すものであった。

以上のようにして調製された、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の薬理作用の確認と、その粒子径が及ぼす薬理効果を確認するために、以下の生物学的試験を行った。

最初に、多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子として、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムをモル比で1 : 1.0で添加することにより、レチノイン酸ミセルの表面に炭酸カルシウム皮膜を形成させて得たレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子のメラノーマ細胞に対する増殖抑制効果検討した。

5 試験例5 : *in vitro* 実験-レチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子の B16 melanoma 細胞への添加実験

レチノイン酸が、B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があることはよく知られている。本試験例により本発明が提供するレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子であっても、その B16 melanoma 細胞に対して増殖抑制効果があるかどうか、またその効果は、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独に比較して、どのように効果的なものであるかを検討するため、以下の試験を行った。

(方法)

B16 melanoma 細胞 (2 × 10⁴) を24時間培養した。その後、レチノイン酸および上記のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子を、培地に添加した。その後さらに48時間培養を行い、³H-チミジン (³H-thymidine) の取り込み量を測定し、B16 melanoma 細胞のDNA合成能を比較した。

(結果)

その結果を第3図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、その添加量の増加にしたがって、ナノ粒子化しないレチノイン酸単独添加よりも、高い増殖抑制効果を示すことが理解される。

したがって、レチノイン酸をナノ粒子化した本発明のレチノイン酸-CaCO₃ナノ粒子は、B16 melanoma 細胞に対して極めて効果的に増殖抑制効果を発揮するものであることが判明した。

25

試験例6 : *in vivo* 実験-ラットに皮下投与した場合の血中動態試験

(1) 皮下投与の場合

(方法)

Wistar 系ラット (7週齢/雄性) を使用し、ラットの皮下にトリチウム (³H)

ラベルのレチノイン酸およびトリチウム (^3H) ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーションカウンターにて測定した。

5 なお、試験にはレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：150 nm）を使用した。

また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸ミセルとして投与した。

（結果）

10 第4図に、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子（平均粒子径：約150 nm）を皮下投与した場合の結果を、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルの場合と比較して示した。

15 図中の結果からも判明するように、比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルの場合には、投与後約1時間でレチノイン酸が血中に放出されてしまうのに対して、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子の場合は、初期血中濃度が抑えられ
ると共に、持続的であり、レチノイン酸のナノ粒子からの放出は約7日間継続していた。

以上の結果から、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は、レチノイン酸の徐放化効果が顕著に認められており、徐放化製剤として極めて有効なものであることが確認された。

20 また、第5図および第6図に投与10日後の投与皮下部位の写真を示した。第5図は比較例であるナノ粒子化しないレチノイン酸ミセルを投与した場合の写真であり、第6図はレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合の写真である。
レチノイン酸ミセルを投与した場合には、レチノイン酸の刺激性により投与部位で炎症を起しているが、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子を投与した場合には、
25 レチノイン酸の刺激性が緩和されており、その結果炎症を全く惹起していないものであった。

以上の結果から、レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子は皮膚刺激性が低く、外用製剤として皮膚投与、あるいは化粧品として皮膚への適用をし得るものであることが判明した。

(2) 皮膚投与(塗布)の場合

マウス(ddY系、5週齢/雄性)を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて剪毛して、上記で得たトリチウム(^3H)ラベルのレチノイン酸およびトリチウム(^3H)ラベルのレチノイン酸のミセルから得たレチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子を、ワセリン基剤に混合し、皮膚に塗布した。その後時間ごとに血液を採取し、血中のレチノイン酸の量を、シンチレーションカウンターにて測定した。

試験に供した試料は、以下のものである。

- (a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子(平均粒子径: 約20 nm)。
- 10 (b) レチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子(平均粒子径: 約20 nm)。

また、比較例としてのレチノイン酸は、ナノ粒子化していない、レチノイン酸そのものをワセリン基剤と混合して使用した。

(結果)

第7図に、その結果を示した。レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子(平均粒子径: 約20 nm) およびレチノイン酸- ZnCO_3 ナノ粒子(平均粒子径: 約20 nm) ワセリン基剤に混合して皮膚塗布投与した場合、ナノ粒子化していないレチノイン酸に比較して、レチノイン酸の血中濃度は顕著に高いものであった。

したがって、本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、その平均粒子径を調整し、特に微細なナノ粒子とすることにより、より効果的にレチノイン酸の薬理効果を発揮し得るものとなることが判明した。

試験例7: *in vivo* 実験-皮膚投与における表皮細胞の増殖効果(マウス)

(方法)

マウス(ddy系、5週齢/雄性)を使用し、マウスの背部を電気バリカンにて剪毛して、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤(レチノイン酸として0.1%製剤)を、1日10 mg/cm²量塗布し、連続4日間に渡り塗布を行った。5日目に塗布部の表皮の厚さを測定した。

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

- (a) レチノイン酸- CaCO_3 ナノ粒子(平均粒子径: 約20 nm)。

(b) レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。

(c) 塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Ca ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。

5 (d) 塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Zn ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。

(e) レチノイン酸単独。

なお、コントロールとして無処理群および基剤としてのワセリンのみ塗布群をおいた。

10 (結果)

その結果を第 8 図に示した。図中の結果からも明らかなように、本発明の有効成分であるレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子およびレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子は、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞を増殖させ、表皮の厚みが顕著に増大していることが理解される。

15 なお、塩化カルシウムのみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面をカルシウムで被覆したレチノイン酸-Ca ナノ粒子 [RA-Ca] および塩化亜鉛のみをレチノイン酸ミセルに添加することにより得た、ミセル表面を亜鉛で被覆したレチノイン酸-Zn ナノ粒子 [RA-Zn] も、レチノイン酸単独に比較して表皮の厚みが増大している。このことは、レチノイン酸をミセルとして形成
20 させ、金属ハロゲン化物または酢酸化物により安定化させたものにも、レチノイン酸含有製剤に比較して有意に表皮細胞増殖効果が認められることを示すものであり、本発明の一部を構成するものである。

試験例 8 : *in vivo* 実験 HB-EGF mRNA 産生試験 (マウス)

25 (方法)

マウス (ddY 系、5 週齢/雄性) の耳介に、レチノイン酸含有ワセリン基剤製剤 (レチノイン酸として 0.1%) を、1 日 30 mg/耳介塗布し、連続 4 日間に渡り塗布を行った。5 日目に耳を切除し、RNA を抽出し、real-time PCR 法により、HB-EGF mRNA を測定した。

なお、同時に House-keeping gene として GAPDH (リン酸グリセルアルデヒド脱水素酵素: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA も合成および測定し、相対値として定量した。

使用したレチノイン酸としては、以下のものである。

- 5 (a) レチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。
(b) レチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm)。
(c) レチノイン酸単独。

(結果)

- 10 その結果を第 9 図に示した。図中に示した結果からも判明するように、本発明の粒径を調整して得たレチノイン酸-CaCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm) およびレチノイン酸-ZnCO₃ ナノ粒子 (平均粒子径: 約 20 nm) は、レチノイン酸単独よりも、有意に HB-EGF mRNA を産生していることが理解される。

- 15 HB-EGF mRNA は、上皮細胞の増殖因子であることより、この産生量を増大させることは本発明の多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が皮膚再生能を、顕著に発揮している事実を示すものである。

産業上の利用可能性

- 20 以上説明したように、本発明により、レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなる粒径が 5 ~ 300 nm に調整された多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子が提供される。本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、皮膚透過性が高く、水に溶解した場合には透明溶液の形態を保っているため、皮下および静脈内注射製剤として投与することが可能となる。また、多価金属無機塩の皮膜によりレチノイン酸が被覆されていることから低刺激性であり、投与部位における炎症の発生、腫瘍化などがみられない特性を
25 有している。

したがって、本発明が提供する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子は、レチノイン酸の薬理効果を有効に発揮し得るものであって、外用剤あるいは化粧品、さらに再生医療への応用として極めて有効なものであり、その医療上の貢献は多大なものである。

請求の範囲

1. レチノイン酸のミセル表面を多価金属無機塩の皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、
 - 5 レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、2価金属ハロゲン化物または酢酸化物、およびアルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物を、モル比で1 : 0 ~ 1. 0 の範囲内で添加することによりミセル表面に多価金属無機塩の皮膜を形成し、その平均粒子径を5 ~ 3 0 0 nmの範囲内とすることを特徴とする多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 10 2. ミセル表面に被覆される多価金属無機塩の皮膜が、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛またはリン酸カルシウムである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 3. 2価金属ハロゲン化物または酢酸化物が、カルシウムハロゲン化物、亜鉛ハロゲン化物、酢酸カルシウムまたは酢酸亜鉛である請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 15 4. カルシウムハロゲン化物または亜鉛ハロゲン化物が、塩化カルシウム、臭化カルシウム、フッ化カルシウム、ヨウ化カルシウム、塩化亜鉛、臭化亜鉛、フッ化亜鉛およびヨウ化亜鉛からなる群から選択されるものである請求の範囲第3項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 20 5. アルカリ金属炭酸化物またはリン酸化物が、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウムからなる群から選択されるものである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 - 25 6. 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである請求の範囲第1項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
 7. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン(20)ソ

ルピタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である請求の範囲第1
5 項に記載する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

8. レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなるレチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法であって、

レチノイン酸の低級アルコール溶液をアルカリ水溶液と共に分散し、さらに非イオン性界面活性剤を添加することにより調製した混合ミセルに、塩化カルシウムおよび炭酸ナトリウムを、モル比で1：0～1.0の範囲内で添加することによりミセル表面に炭酸カルシウムの皮膜を形成し、その平均粒子径を5
10 ～300 nmの範囲内とすることを特徴とする請求の範囲第1項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。

9. 低級アルコールがメタノールまたはエタノールである請求の範囲第8項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
15

10. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタントリオレート、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）コレステロールエステル、ポリオキシエチレン（30）コレステロールエステルまたはポリオキシエチレン硬化ヒマシ油である請求の範囲第8項に記載する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法。
20

11. 請求の範囲第1ないし7項のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300 nmを有する多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子。
25

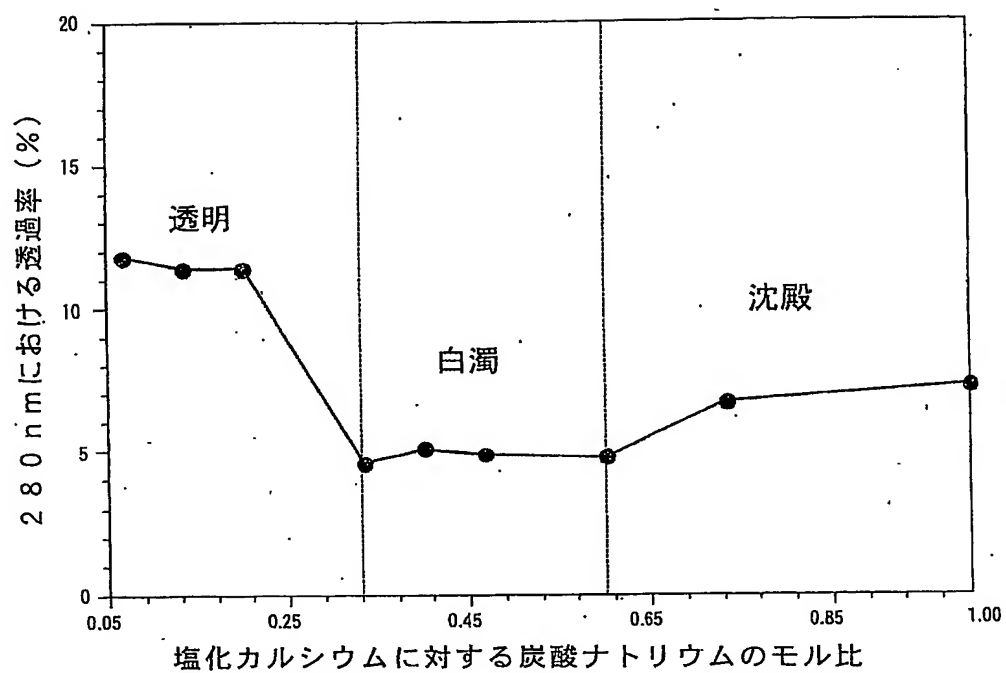
12. 請求項第8ないし10項のいずれかに記載の調整方法により得られた平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子。

13. レチノイン酸のミセル表面を炭酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸カルシウム被覆ナノ粒子。

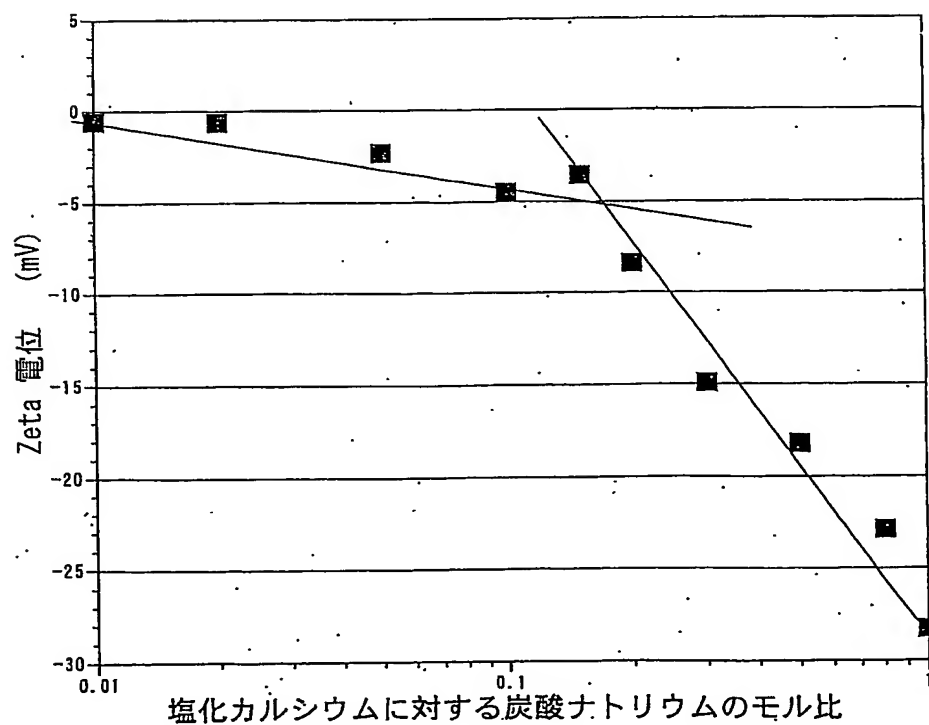
- 1 4. レチノイン酸のミセル表面を炭酸亜鉛の皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300 nmを有する炭酸亜鉛被覆レチノイン酸ナノ粒子。
- 1 5. レチノイン酸のミセル表面をリン酸カルシウムの皮膜で被覆してなる平均粒子径が5～300 nmを有するリン酸カルシウム被覆レチノイン酸ナノ粒子。

1 / 5

第1図

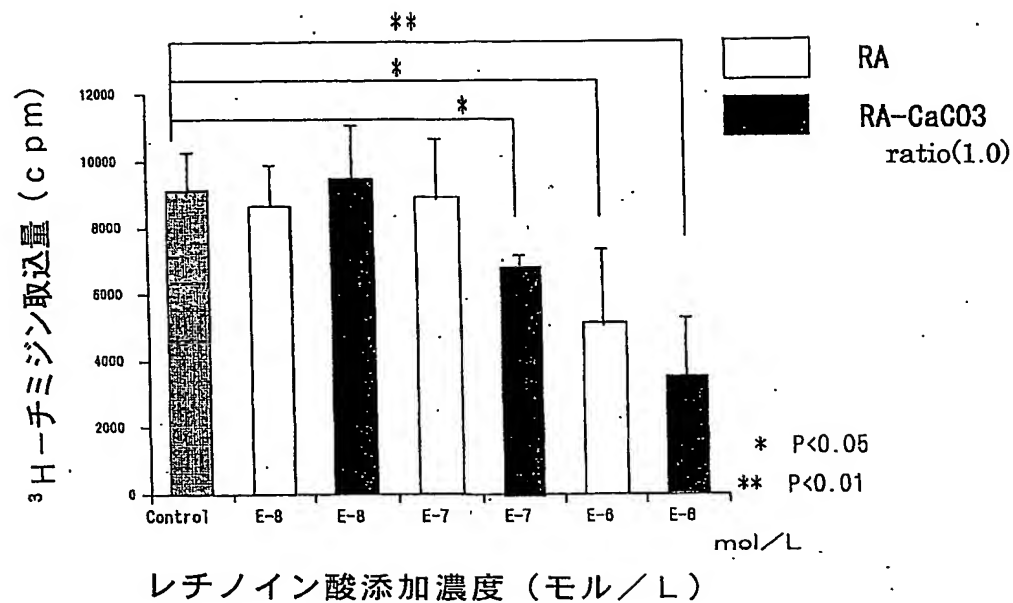


第2図

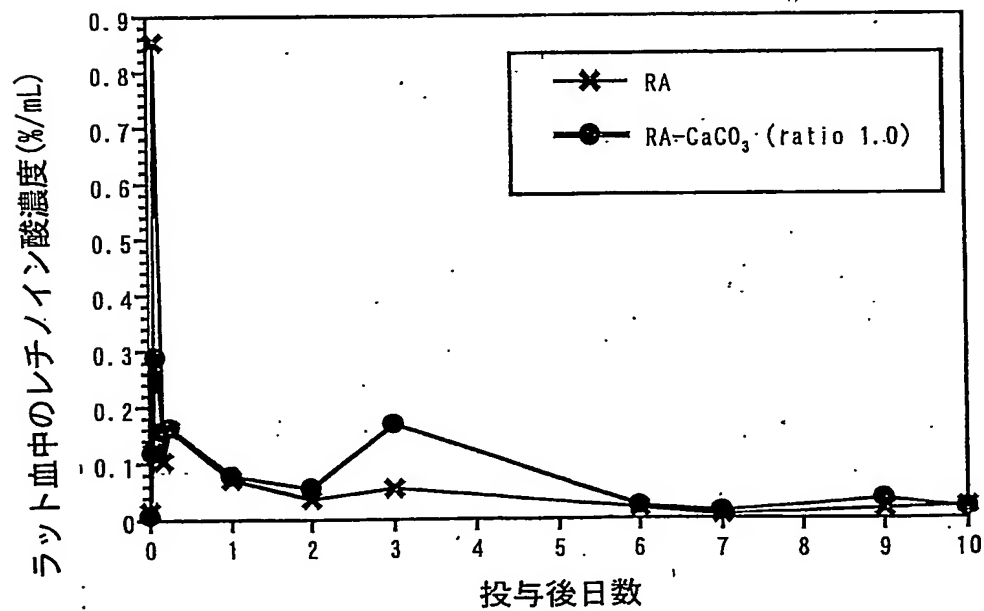


2 / 5

第3図

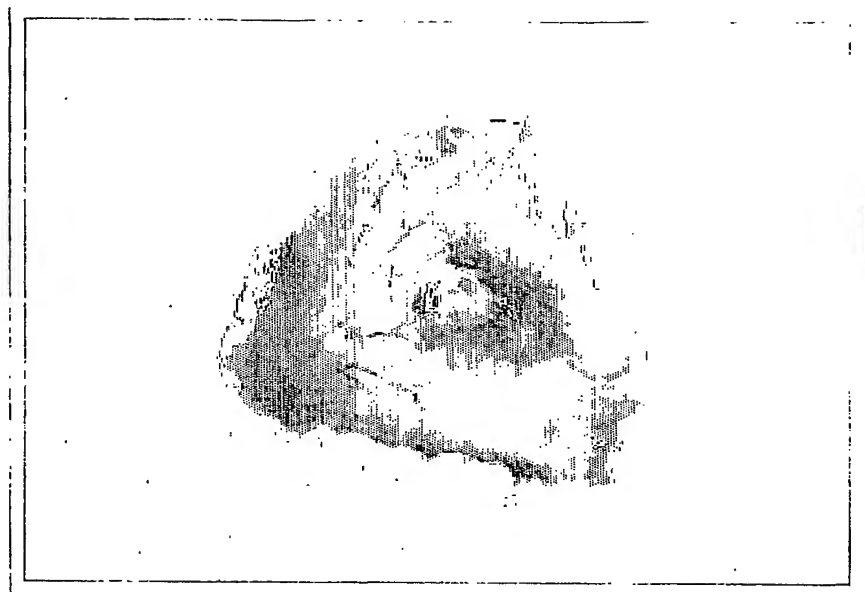


第4図

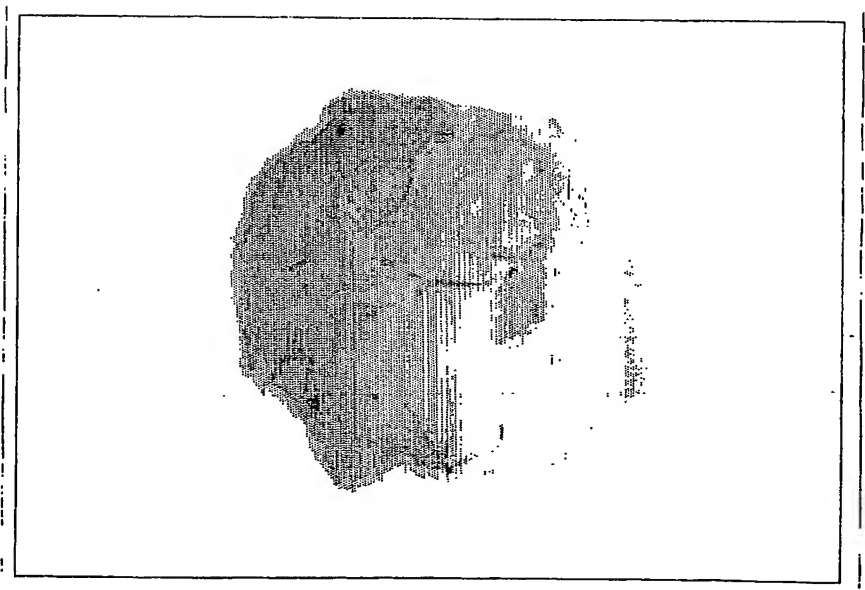


3 / 5

第5図

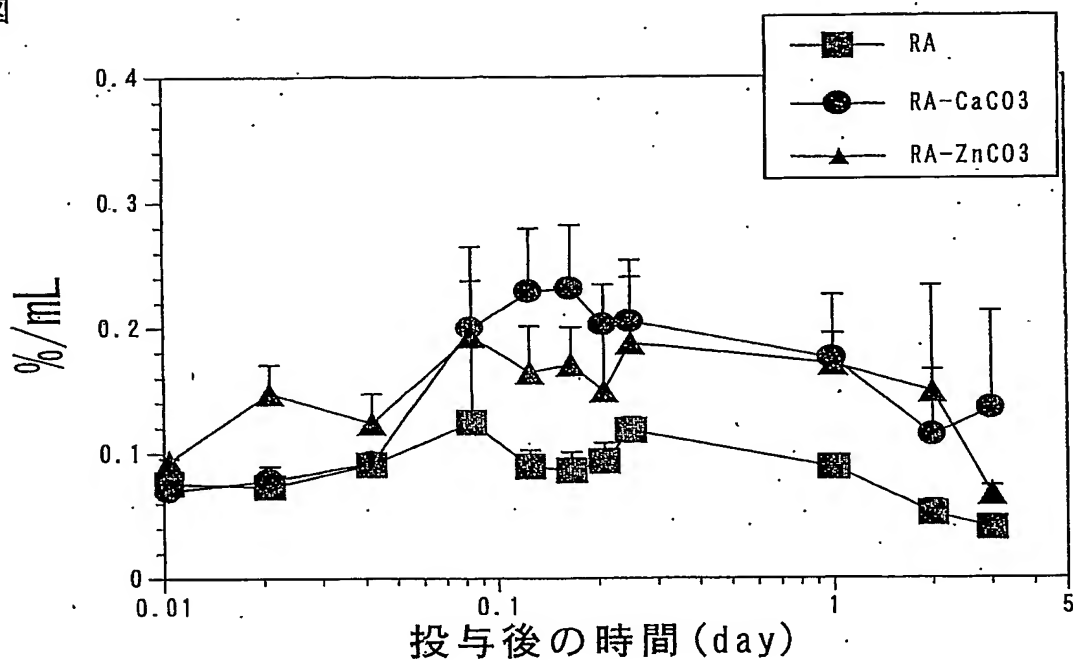


第6図

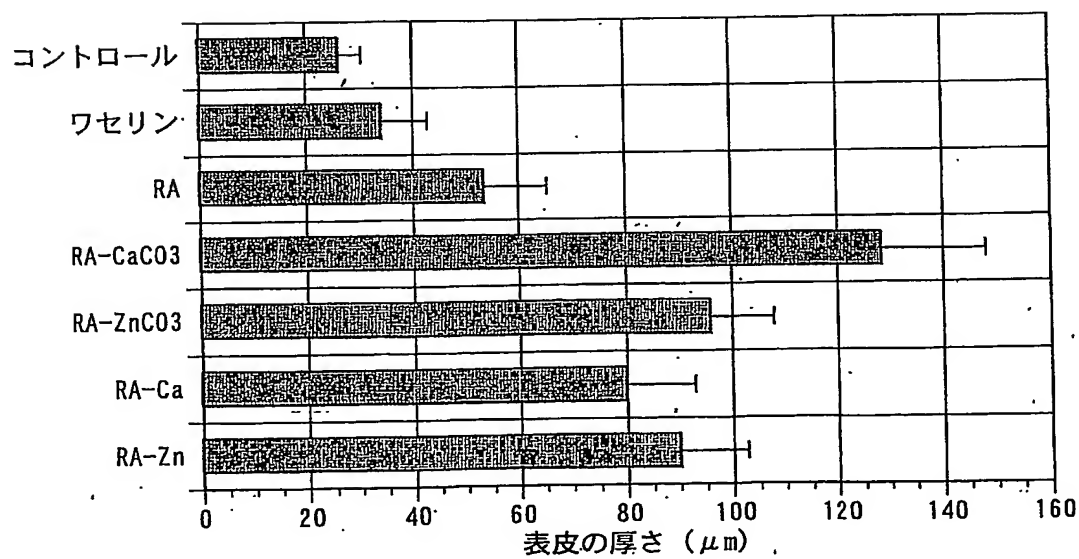


4 / 5

第7図

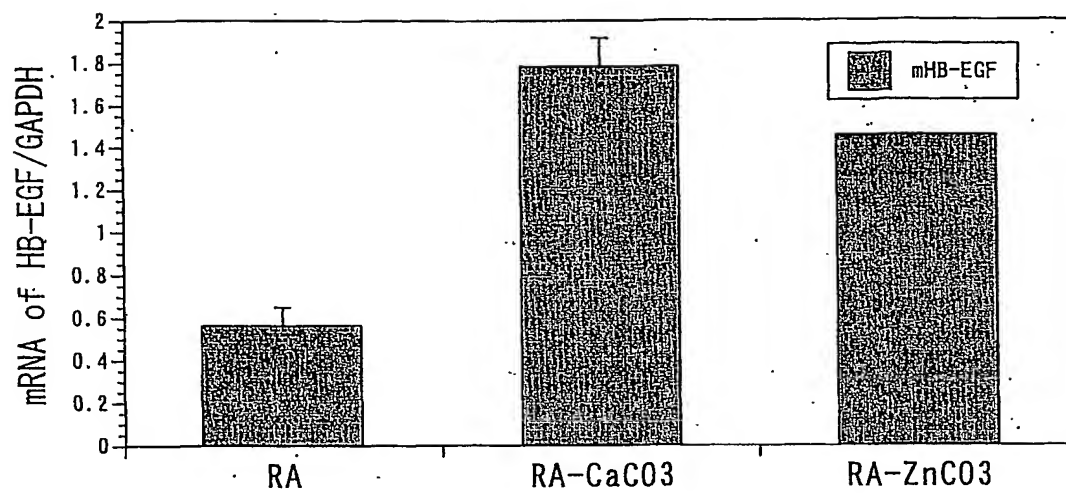


第8図



5 / 5

第9図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yoko YAMAGUCHI, Rie IGARASHI, 'Retinoic Acid Koshitsu Nano Particle no Hifu Saisei eno Kokoromi', Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol.18, No.3, May, page 221	11 1-10,12-15
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.), 19 August, 1993 (19.08.93), In particular, page 3, line 6 to page 4, line 19 & JP 6-506460 A In particular, page 3, upper right column, line 8 to lower left column, line 19	1-10,12-15
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text & JP 2003-529557 A Full text	1-10,12-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 December, 2003 (04.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/203, 9/51, 47/02, 47/10, 47/30, A61P3/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	山口葉子、五十嵐理慧, 「レチノイン酸硬質ナノパーティクルの皮膚再生への試み」, Drug Delivery System (DDS), 2003, Vol. 18, No. 3 May, p221	11 1-10, 12-15
Y	WO 93/15720 A1 (VESTAR INC.) 1993. 08. 19, 特に第3頁第6行-第4頁第19行 & JP 6-506460 A 特に第3頁右上欄第8行-左下欄第19行	1-10, 12-15
Y	WO 01/052817 A2 (BIODELIVERY SCIENCE INC.) 2001. 07. 26 全文 & JP 2003-529557 A 全文	1-10, 12-15

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

24.12.03

国際調査を完了した日

04. 12. 03

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世



4 P

3230

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.